

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

# **Contagem de Folículos Antrais: indicador da reserva ovária e valor prognóstico em ciclos de Procriação Medicamente Assistida**

Patrícia Daniela Martins Moreira

**M**

2018



# Contagem de Folículos Antrais: indicador da reserva ovária e valor prognóstico em ciclos de Procriação Medicamente Assistida

Antral Follicle Count: ovarian reserve indicator and prognostic value in Assisted Reproductive Technologies

Autor: Patrícia Daniela Martins Moreira

- Estudante de Medicina do 6º ano do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
- Email: pdmartinsmoreira@gmail.com

Orientador: Isabel Sousa Pereira

- Assistente Graduada de Ginecologia/Obstetrícia no Centro Materno-Infantil do Norte Dr. Albino Aroso do Centro Hospitalar do Porto
- Assistente convidada da unidade curricular de Ginecologia no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto
- Email: isabelsousapereira07@gmail.com

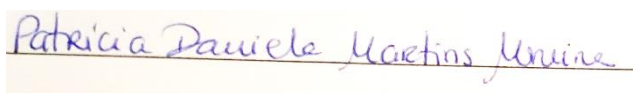
Coorientadora: Alice Fernandes Pinto

- Embriologista clínica sénior e Responsável de Laboratório do Centro Materno-Infantil do Norte Dr. Albino Aroso do Centro Hospitalar do Porto
- Email: alicefpinto@hotmail.com

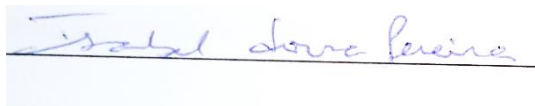
Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Porto, Maio de 2018

**Autor:** Patrícia Daniela Martins Moreira

A handwritten signature in blue ink, reading "Patrícia Daniela Martins Moreira", is written over a horizontal line. The signature is cursive and fluid.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Isabel Sousa Pereira

A handwritten signature in blue ink, reading "Isabel Sousa Pereira", is written over a horizontal line. The signature is cursive and fluid.

Data: 01/06/2018

## **Agradecimentos**

Gostava de agradecer a todos os que me ajudaram, de uma forma ou de outra, na elaboração deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Isabel Sousa Pereira, o meu sincero agradecimento pela orientação, disponibilidade constante, pelas opiniões e críticas, que permitiram alcançar mais um objetivo, nesta etapa final do meu percurso académico.

Saliento também a importância da Dr<sup>a</sup> Alice Pinto, por ter ajudado na realização deste trabalho, assim como a sua disponibilidade e dedicação, imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Não quero deixar de destacar toda a paciência dos meus familiares, especialmente dos meus pais e irmão, por todo o apoio incondicional, paciência e dedicação. Obrigada por terem tornado o sonho realidade.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer a todos os meus amigos de sempre, e aos amigos de curso, que nas alturas mais complicadas sempre estiveram presentes e que me incentivaram a fazer sempre mais e melhor.

## Resumo

**Introdução:** A reserva ovárica é definida como o funcionamento potencial das gónadas femininas, sendo determinada pelo número dos folículos ováricos e pela qualidade dos ovócitos produzidos. Esta reserva diminui com a idade, com impacto significativo na capacidade reprodutiva da mulher. Atualmente, existe uma enorme variedade de marcadores de reserva ovárica tais como, a hormona de estimulação folicular (FSH), a hormona anti-Mülleriana, inibina B, o estradiol e a contagem de Folículos Antrais. O número de folículos antrais é definido pelo número total de folículos, com diâmetro entre 2-5 ou 2-10mm, presentes em ambos os ovários. Uma baixa contagem de Folículos Antrais é usado como preditor de baixa reserva ovárica e baixa resposta à estimulação para os tratamentos de Procriação Medicamente Assistida. O principal objetivo do estudo é avaliar o valor preditivo da contagem dos Folículos Antrais como indicador de reserva ovárica.

**Material e Métodos:** Este foi um estudo retrospectivo, que incluiu 351 casais que realizaram tratamento de ICSI e 353 de FIV, nos anos de 2012 a 2016. Dentro de cada técnica, a amostra foi dividida em dois grupos de acordo com a contagem de Folículos Antrais ( $\leq 5$  e  $> 5$ ). Foi utilizada a correlação de Spearman e de Pearson para medir a associação entre variáveis. O teste do  $X^2$  foi usado para comparar a taxa de gravidez e a contagem dos Folículos Antrais.

**Resultados:** A taxa de gestação na amostra das ICSI foi de 33.6 % e das FIV de 43,1%. Observou-se uma correlação positiva entre a contagem de Folículos Antrais e nº de ovócitos obtidos ( $r_{ICSI}= 0,479$ ;  $r_{FIV}=0,415$ ;  $p<0,05$ ), nº de embriões ( $r_{ICSI}= 0,215$ ;  $r_{FIV}=0,200$ ;  $p<0,05$ ) e uma correlação negativa com FSH ( $r_{ICSI}= -0,172$ ;  $r_{FIV}= -0,281$ ;  $p<0,05$ ). As correlações entre a idade do elemento feminino e o nº de folículos ( $r_{ICSI}= -0,262$ ;  $r_{FIV}= -0,178$ ;  $p<0,05$ ) e o nº ovócitos obtidos ( $r_{ICSI}= -0,205$ ;  $r_{FIV}= -0,207$ ;  $p<0,05$ ) foram negativas. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos com diferente nº de folículos e o teste de gravidez positivo ( $p_{ICSI}=0,43$ ;  $p_{FIV}=0,202$ ).

**Conclusão:** A Contagem de Folículos Antrais decresce ao longo dos anos, é fator preditor do nº de ovócitos obtidos, bem como do nº de embriões normais obtidos, e pode prever a probabilidade de sucesso em tratamentos de Procriação Medicamente Assistida.

**Palavras-Chave:** Contagem Folículos Antrais; Reserva ovárica, Infertilidade; Procriação Medicamente Assistida; Indução da ovulação

## Abstract

**Introduction:** The ovarian reserve is defined as the potential capacity of the of the ovary determined by the number of ovarian follicles and the amount of oocytes that produced. This reserve decreases as age goes by which as great impact in women's reproductive ability. Nowadays, there is a big variety of ovarian reserve markers such as follicle stimulating hormone (FSH), anti-Müllerian hormone, inhibin B, estradiol and antral follicle count. The number of antral follicle is the total number of follicles with diameters between 2-5 and 2-10mm found in both ovaries. A low number of antral follicles predicts low ovarian reserve and consequently poor response to Assisted Reproductive Technologies. The main goal of this study is to evaluate the predictive value of antral follicle count as an indicator of ovarian reserve.

**Materials and Methods:** This was a retrospective study that includes 351 couples that have had Intracytoplasmic Microinjection and 353 couples that have had In Vitro Fertilization treatments from 2012 to 2016. In each technique the sample was divided into two groups according to the antral follicle count ( $\leq 5$  e  $> 5$ ). Spearman and Pearson correlation was used to measure the variables association.  $\chi^2$  test was used to compare the pregnancy rate with the antral follicle count.

**Results:** ICSI's success rate was 33.6 % and FIV's was 43,1%. A positive correlation between antral follicle count and the number of retrieved oocytes was noticed ( $r_{ICSI}= 0,479$ ;  $r_{FIV}=0,415$ ;  $p<0,05$ ), number of embryos ( $r_{ICSI}= 0,215$ ;  $r_{FIV}=0,200$ ;  $p<0,05$ ) and a negative correlation with FSH was brought to light ( $r_{ICSI}= -0,172$ ;  $r_{FIV}= -0,281$ ;  $p<0,05$ ). Correlations between the female's age and the number of follicles ( $r_{ICSI}= -0,262$ ;  $r_{FIV}= -0,178$ ;  $p<0,05$ ) and the number of retrieved oocytes ( $r_{ICSI}= -0,205$ ;  $r_{FIV}= -0,207$ ;  $p<0,05$ ) were negative. No significant difference when comparing groups with different number of follicles and positive pregnancy test ( $p_{ICSI}=0,43$ ;  $p_{FIV}=0,202$ ).

**Conclusion:** Antral follicle count decreases throughout the years and is a predictor factor of the number of retrieved oocytes obtained as well as the number of normal embryos obtained which allows some predictability of success in Assisted Reproductive Technologies.

**Keywords:** Antral follicle count; Ovarian Reserve; Infertility; Reproductive Techniques, Assisted; Ovulation Induction

## Lista de Abreviaturas

**$\beta$ -HCG:** Hormona Gonadotrófica Coriônica Humana

**CFA:** Contagem de Folículos Antrais

**FIV:** Fertilização in vitro

**ICSI:** Injeção Intracitoplasmática de espermatozóide

**IMC:** Índice de Massa Corporal

**HAM:** Hormona anti-Mülleriana

**LH:** Hormona lúteo- estimulante

**FSH:** Hormona folículo- estimulante

**GnRH:** Hormona libertadora de gonadotrofinas

**PMA:** Procriação Medicamente Assistida

## Índice

Introdução.....	1
Materiais e Métodos .....	3
Resultados.....	5
Discussão.....	6
Figuras e Tabelas .....	9
Bibliografia .....	15



## **Lista de figuras**

**Fig. 1-** Fluxograma do nº de casais incluídos e excluídos no estudo

**Fig. 2-** Distribuição dos nados-vivos, pelos grupos da Contagem de Folículos Antrais

**Fig. 3-** Distribuição do  $\beta$ -HCG, pelos grupos da Contagem de Folículos Antrais

**Fig. 4-** Barra de erros de IMC, nos dois grupos de Contagem de Folículos Antrais, nas ICSI

**Fig. 5-** Barra de erros de IMC, nos dois grupos de Contagem de Folículos Antrais, nas FIV

## **Lista de Tabelas**

**Tabela I-** Causas de infertilidade

**Tabela II-** Características clínicas, demográficos e laboratoriais dos 351 casos submetidos a ICSI

**Tabela III-** Características clínicas, demográficos e laboratoriais dos 353 casos submetidos a FIV

**Tabela IV-** Correlação entre a CFA e o nº de ovócitos obtidos, nº de embriões normais obtidos, nados-vivos e FSH, nas ICSI

**Tabela V-** Correlação entre a CFA e o nº de ovócitos obtidos, nº de embriões normais obtidos, nados-vivos e FSH, nas FIV

**Tabela VI-** Correlação entre a idade do elemento do género feminino e FSH, folículos antrais e ovócitos obtidos nas ICSI

**Tabela VII-** Correlação entre a idade do elemento do género feminino e FSH, folículos antrais e ovócitos obtidos nas FIV

**Tabela VIII-** Resultado do b-HCG e nados-vivos

**Tabela IX-** Comparação entre b-HCG positivo e negativo e os grupos formados pela divisão da CFA, nas ICSI

**Tabela X-** Comparação entre b-HCG positivo e negativo e os grupos formados pela divisão da CFA, nas FIV

## Introdução

A fertilidade feminina começa a diminuir aos 30 anos, resultando principalmente da diminuição de gâmetas disponíveis, sendo esta uma consequência de um processo contínuo de depleção folicular.<sup>1,2</sup> Embora todas as mulheres tenham esta diminuição, é difícil prever de forma individual o ritmo de declínio da reprodução.<sup>3,4</sup> Assim, é de salientar a importância da diminuição da reserva ovárica com idade, como uma função biológica e não cronológica.<sup>5,6</sup>

A reserva ovárica, é determinada pelo tamanho do pool folicular primário, que é estabelecido durante a vida fetal. Na 16ª semana de vida fetal, existem aproximadamente sete milhões de folículos em ambos os ovários. Cada folículo primordial é constituído por um oócito, rodeado de células somáticas.<sup>7</sup> No nascimento, cerca de dois milhões de folículos estão presentes, e na menarca apenas 300.000 a 400.000 permanecem.<sup>8</sup> Em cada ciclo menstrual, geralmente apenas um folículo é selecionado para se tornar dominante, e, portanto, resultar em ovulação. Como este processo é contínuo ao longo da vida, o número de folículos é esgotado, levando à menopausa.<sup>9</sup>

Reserva ovárica é um termo usado para descrever o potencial funcional dos ovários, refletindo o número de folículos e eventual qualidade ovocitária.<sup>10</sup> Este é um fenómeno clínico complexo, influenciado pela genética, idade e fatores ambientais.<sup>8</sup> Nas duas últimas décadas, a reserva ovárica foi identificada como um indicador do sucesso das técnicas de procriação medicamente assistida, permitindo avaliar e planejar as intervenções a realizar.<sup>11</sup>

A avaliação da reserva ovárica permite a personalização do protocolo de tratamento a usar, com o objetivo de prever tanto uma má resposta, como uma hiperresposta (grande probabilidade de Síndrome de Hiperestimulação Ovárica).<sup>5,9,11</sup> Está bem estabelecido que o sucesso das técnicas de PMA depende tanto da estimulação do ovário como da supressão da hipófise.<sup>5</sup> Assim, os marcadores de reserva ovárica, permitem avaliar a dose individual de gonadotrofinas exógenas e análogos da GnRH, que são necessários para maximizar o sucesso da técnica usada.<sup>5,11</sup>

Vários são os métodos de avaliação da reserva ovárica usados na prática clínica, desde marcadores biológicos (idade), bioquímicos (FSH, Estradiol, Inibina B, Hormona anti-Mülleriana) e biofísicos (Contagem de Folículos Antrais, volume ovariano total e fluxo das artérias uterinas).<sup>12,13</sup>

A FSH é produzida na hipófise anterior e estimula as células granulosas dos ovários a expressar aromatase. Assim, estas células dos folículos antrais precoces convertem androgénios em estrogénios; estes estrogénios diminuem a secreção de FSH através de feedback negativo.<sup>9</sup> Enquanto o pool de folículos diminui, os níveis de estradiol também diminuem, e

consequentemente os níveis sanguíneos de FSH aumentam. A FSH era um marcador previamente aceite, avaliado em combinação com a idade, estando o seu valor elevado associado a menores taxas de gravidez.<sup>14</sup> No entanto, os níveis de FSH podem flutuar ao longo do ciclo menstrual, sendo também afetados por variações hormonais artificiais, nomeadamente pelo uso de anti-contracetivos orais. Daí que, em alguns casos, este método tenha sido substituído.<sup>15</sup>

A hormona anti-Mülleriana (HAM) é uma glicoproteína homodimérica, produzida essencialmente nas células granulosas dos pequenos e grandes folículos ováricos pré-antrais e dos pequenos folículos antrais, estando ausente nos folículos primordiais, nas células da teca e nos folículos atresícos.<sup>7,16</sup> A HAM é altamente expressa durante o tempo de vida reprodutiva, com ausência de flutuação dos seus valores durante os ciclos.<sup>17</sup> O desenvolvimento tecnológico tornou a medição da HAM mais sensível, no entanto, o seu uso exclusivo não foi adotado por todos os centros de PMA, devido a variações nos sistemas de medição.<sup>15</sup>

A contagem de Folículos Antrais (CFA) é definida pelo número total de folículos, com diâmetro entre 2-10mm, presentes em ambos os ovários. Tem sido demonstrado que, o número de folículos antrais nos ovários é proporcional ao tamanho do *pool* folicular primário, a partir do qual são recrutados. Além disso, os folículos antrais respondem ao FSH e pode ser um preditor de resposta ovárica.<sup>11</sup> Já em 2005, uma meta-análise mostrou que uma CFA abaixo de uma média de 5.2 (variação de 3-6) estava associada a má resposta ovárica, e vários são os estudos que se seguiram e obtiveram resultados semelhantes.<sup>1,5,18</sup>

A CFA destaca-se entre os diversos testes por ser um método pouco invasivo e de fácil realização.<sup>3</sup> A maior vantagem da CFA sobre a HAM, é que ao avaliar a reserva funcional do ovário, permite avaliar outros aspetos importantes, como a presença de endometriomas ou outras lesões ováricas.<sup>19,20</sup> Uma desvantagem, é a falta de padronização nos equipamentos de ultrassom, na técnica usada e no tamanho dos folículos antrais, levando a resultados diferentes, de acordo com os centros.<sup>21</sup> Neste sentido, recentemente foi publicado um consenso que propõe uma padronização da técnica da contagem de folículos, através de ecografia transvaginal, usando uma frequência  $\geq 7\text{MHz}$ .<sup>19</sup> Além disto, tem como limitação, a incapacidade de revelar a resposta à terapêutica, incluindo-se na contagem também aqueles que não irão responder.<sup>12</sup>

A CFA parece refletir o número de folículos primordiais remanescentes, bem como o número de oócitos aspirados, influenciando o número de embriões disponíveis para seleção, transferência e congelamento.<sup>21,22</sup> Assim, este método ajuda não só prever a possibilidade de sucesso das técnicas de PMA, como a gerir a expectativa, carga emocional e custos dos casais que procuram estas técnicas.<sup>15,23</sup>

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a CFA como indicador de reserva ovárica, predizendo o número de oócitos captados em pacientes submetidas a ciclos de hiperestimulação ovárica controlados para ICSI e FIV. Também pretende demonstrar se há correlação entre a idade materna e a CFA, bem como estabelecer a relação entre a CFA e o desfecho dos tratamentos (taxa de gravidez e nados-vivos).

## **Materiais e Métodos**

Foi realizado estudo observacional, retrospectivo, institucional (Centro de Procriação Medicamente Assistida do Centro Materno Infantil do Norte), de casais que recorreram à consulta de apoio à fertilidade, e que iniciaram tratamentos de Procriação Medicamente Assistida (PMA), nos anos de 2012 a 2016. Os casais submetidos a este tipo de tratamentos foram informados da possibilidade de utilização de seus dados clínicos em estudos científicos, de forma anónima, sem qualquer prejuízo pessoal, sendo obtida assinatura de consentimento livre e informado. O estudo foi aprovado pelo Departamento de Ensino, Formação e Investigação e posteriormente submetido ao Conselho de Ética do Hospital de Santo António – Centro Hospitalar do Porto, respeitando todos os princípios éticos estabelecidos na declaração de Helsínquia.

Neste estudo, foram incluídos 1040 casais selecionados para a realização de ICSI e de 832 para a realização de FIV, tendo sido excluídos 689 e 479, respetivamente. Os fatores de exclusão aplicados neste estudo foram: casos em que houve tratamentos de PMA subsequentes, casais com fator masculino muito grave ( $<1 \times 10^6$  spz/mL), ciclos com recurso a esperma lavado ou a doação de gâmetas, ciclos sem transferência embrionária (por ausência de fecundação ou risco de SHEO). Assim, a amostra final é constituída por 351 casais que realizaram técnica de ICSI e 353 de FIV (figura 1).

Dentro de cada técnica, a amostra foi dividida em dois grupos: contagem de Folículos Antrais (CFA) igual ou inferior a cinco e superior a cinco folículos antrais. Esta divisão foi realizada com base nos artigos selecionados.

Entre as causas de infertilidade (tabela I), o fator masculino contribuiu em 46,2 % dos casos submetidos a ICSI, enquanto nos casais em que foi usada a técnica FIV, a principal causa de infertilidade foi ovulatória (20,4%).

Foram usados dois protocolos distintos de estimulação ovárica – agonista e antagonista, conforme Fig.1.

Na execução do protocolo de ciclo agonista, utilizou-se agonista GnRH, em injeção subcutânea diária à mesma hora, iniciado entre o 21º e 23º dia do ciclo menstrual. Após 15 dias, em data combinada, foi realizada ecografia transvaginal para avaliação da espessura endometrial, e morfologia ovárica e foi feita dosagem sérica de estradiol. Após confirmação da supressão hipofisária, iniciou-se estimulação ovárica com gonadotrofinas recombinantes ou urinárias altamente purificadas ou uma combinação destas 2 últimas, cerca de 12 dias, com doses individualizadas.

Na execução do protocolo de ciclo antagonista a estimulação ovárica foi iniciada no 2º/3º dia do ciclo menstrual, em doses individualizadas, durante 5 dias. Posteriormente, foi realizada ecografia transvaginal com a finalidade de avaliar o nº de folículos em desenvolvimento. A administração do antagonista do GnRH na dose única diária de 0,25ml por via subcutânea foi feita quando o folículo atingiu 13mm diâmetro.

A monitorização do tratamento dos dois protocolos foi feita através de ecografia pélvica transvaginal e análises seriadas, até completo desenvolvimento folicular (pelo menos dois folículos com diâmetro médio maior ou igual a 17mm). Nesse mesmo dia, foi aplicada, por via subcutânea, a gonadotrofina coriônica humana recombinante.

36 horas após, foi realizada aspiração folicular para a colheita de ovócitos, por via vaginal, guiada por ecografia transvaginal, sob sedação. No dia da colheita dos gametas, foram iniciados comprimidos vaginais de Progesterona micronizada, e mantida pelo menos até a data da realização de B-hcg – 15 dias após a punção folicular. A progesterona foi mantida até ser constatada gravidez bioquímica, pela positividade de  $\beta$ -HCG.

Para a análise estatística utilizou-se o teste-t de Student para a comparação de médias, e quando adequado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. A correlação de Spearman foi usada, para medir a correlação entre folículos antrais e embriões normais, nados-vivos e FSH. A correlação de Pearson mediu a correlação entre a idade do elemento do sexo feminino e a FSH, nº de folículos antrais e ovócitos obtidos. A comparação entre os grupos formados pela divisão da contagem dos folículos antrais e beta-HCG positivo foi realizada pelo teste do  $\chi^2$ .

A análise estatística foi realizada recorrendo ao software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®), considerando  $p < 0.05$  para significância estatística.

## Resultados

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos casos incluídos no estudo, estão resumidos na tabela II referidas aos tratamentos de ICSI e na tabela III aos tratamentos de FIV.

A amostra dos casos submetidos a ICSI era constituída por 351 pacientes com média de idades do elemento do género feminino de  $33,6 \pm 3,7$  anos e do género masculino de  $35,4 \pm 4,7$ . O tempo de infertilidade médio destes casais foi de  $3,5 \pm 2,1$  anos. Os resultados demográficos, dos 353 casos que realizaram técnica de FIV, são muito semelhantes, sem diferença estatisticamente significativa entre as técnicas (tabela III).

Na figura 4 e 5 é possível verificar uma maior variação de valores de IMC, e valores superiores, no grupo de doentes com  $\leq 5$  Folículos Antrais, em comparação com o grupo que tem  $> 5$  Folículos, embora não seja estatisticamente significativo.

A média da contagem de Folículos Antrais obtidos nas ICSI e FIV foi de  $9,26 \pm 3,57$  e  $9,0 \pm 3,61$ , respetivamente, e o nº médio de ovócitos foi de  $9,3 \pm 6,2$  nas ICSI e  $8,3 \pm 4,9$ , nas FIV, conforme a tabela II e III. A taxa média de fecundação normal foi ligeiramente maior nas FIV (61,3%), que nos de ICSI (58,1%).

Considerando a contagem de Folículos Antrais como variável principal, encontrou-se por meio do coeficiente de Spearman, correlação positiva com o número de embriões normais obtidos ( $r=0,215$ ;  $p<0,05$ ), e com os nados-vivos ( $r=0,109$ ;  $p<0,05$ ), conforme tabela IV. Isto significa que, quando maior a CFA, maior o número de embriões normais obtidos e maior o nº de nados-vivos. No entanto, esta correlação com os nados-vivos, não foi estatisticamente significativa nos casos submetidos a FIV (tabela V). Por outro lado, a correlação com FSH é negativa ( $r= - 0,172$ ;  $p<0,05$ ), tabela IV, ou seja, quanto maior a CFA, menor o valor de FSH. A correlação entre a CFA e o número de ovócitos obtidos é fortemente positiva. ( $r_{ICSI}=0,479$ ;  $r_{FIV}=0,415$ ;  $p<0,05$ ).

Através do meio do coeficiente de Pearson ficou demonstrada uma correlação positiva, entre a idade do elemento do género feminino do casal e o FSH ( $r=0,131$ ,  $p<0,05$ ), tabela VI; no entanto esta correlação não é estatisticamente significativa no grupo de casais submetidos a FIV ( $r=0,083$ ,  $p=0,119$ ), tabela VII. Ficou ainda demonstrada uma correlação negativa, entre a idade do género feminino e o número de ovócitos obtidos, em ambas as técnicas ( $p<0,05$ ), o que significa que, quanto maior a idade, menor foi o número de ovócitos obtidos.

Entre os 351 pacientes que realizaram o teste de  $\beta$ -HCG, 118 apresentaram resultado positivo, ou seja, a taxa de gravidez clínica nos casais submetidos a ICSI foi de 33,6%. No entanto,

houve apenas 21,6% de casos com nados-vivos (18,8 % com um nado-vivo e 2,8 % de casos com 2 nados-vivos, resultantes de gestação gemelar). No caso dos 353 pacientes que realizaram tratamentos de FIV, a percentagem de resultados de  $\beta$ -HCG positivo foi ligeiramente maior mas sem tradução estatística, cerca de 43,1% dos casos, que por sua vez, cursou com maior número de nados-vivos, 26,9% dos casos (tabela VIII).

Ao dividir os pacientes em dois grupos de acordo com o número de Folículos Antrais,  $\leq 5$  e  $>5$ , e compará-los por meio do teste do  $X^2$ , foi obtido  $\beta$ -HCG positivo em 28,8% e 34,4%, respetivamente (tabela IX). Esta tendência de aumento percentual de casos com  $\beta$ -HCG positivo, com o aumento do número de Folículos Antrais, também ocorreu no grupo de casais que realizaram FIV (tabela X). Porém, esta diferença percentual não é significativa, em ambas as técnicas, com  $p_{\text{ICSI}}=0,43$  e  $p_{\text{FIV}}=0,202$ .

## Discussão

O conceito de “envelhecimento reprodutivo” sugere que, o declínio do pool folicular relacionado com a idade cronológica, determina a perda da fertilidade feminina.<sup>4</sup> No entanto, apenas a idade não prediz de forma confiável a capacidade reprodutiva da mulher.<sup>21</sup> Por este motivo, outros métodos têm sido estudados, a fim de distinguir aquelas pacientes que ainda podem ser consideradas férteis, daquelas que se estão a aproximar da diminuição da sua capacidade reprodutiva.<sup>8</sup>

Tendo em conta que, a CFA depende do tamanho do pool folicular primordial do qual os folículos são recrutados, quanto maior o nº de folículos primordiais presentes, mais poderão crescer.<sup>8,21</sup> Isto sugere que a CFA possa ser um método de avaliação da capacidade reprodutiva.<sup>3</sup>

Não existe consenso a respeito do melhor preditor do desenvolvimento folicular induzido pelas gonadotrofinas exógenas.<sup>21</sup> Neste sentido, Chamlumeau *et al.* realizaram um estudo recente, com o objetivo de integrarem parâmetros clínicos e biológicos, criando um score, que avalia o índice de sensibilidade ovárica, ou seja, a resposta ovárica à estimulação.<sup>24</sup>

Neste estudo, foi avaliada a correlação entre a CFA com o nº de ovócitos obtidos, idade materna e taxa de gravidez após estímulo ovárico controlado para ICSI e FIV.

Neste estudo, verificamos uma correlação fortemente positiva entre a CFA e o nº de ovócitos obtidos ( $r_{\text{ICSI}}=0,479$ ;  $r_{\text{FIV}}=0,415$ ;  $p<0,05$ ), o que significa que, quando maior o nº de folículos, maior nº de ovócitos colhidos. Tal como no nosso, um estudo que envolveu 193 pacientes sujeitas

a técnica de FIV, também obteve uma correlação positiva e significativa entre a CFA e nº de ovócitos obtidos, confirmando que a CFA é um marcador de resposta ovárica, com capacidade preditiva.<sup>21</sup>

Uma outra correlação obtida, foi entre a CFA e o nº de embriões viáveis, mostrando que, para além da CFA ser um bom preditor de reserva, pode fazer prever a probabilidade de sucesso de tratamento. Um estudo prospetivo, que incluiu 120 mulheres que realizaram o primeiro tratamento de FIV, também obteve uma associação entre a CFA e os embriões de boa qualidade.<sup>25</sup> Além deste, Sanverdi *et al* concluíram que a CFA é um bom preditor do nº de oócitos recuperados, e de boa qualidade de embriões disponíveis para transferência e congelamento.<sup>26</sup>

Neste estudo, não houve diferença significativa após a comparação entre grupos com diferente CFA e grupos com teste de gravidez positivo. Após a divisão em dois grupos,  $\leq 5$  e  $> 5$  folículos antrais, foi observado um aumento percentual do teste de gravidez, no grupo com maior CFA, porém sem significância estatística. Ao contrário do nosso, um estudo retrospectivo de Zakhari *et al.*, que incluiu 507 mulheres, estas foram divididas em dois grupos de acordo com a CFA ( $\leq 5$  e  $> 5$ ), tendo demonstrado uma taxa de gravidez clínica e de taxa de natalidade superior no grupo com maior contagem, com resultados estatisticamente significativos. Assim, demonstraram que para além da CFA ser um bom indicador de reserva ovárica, também demonstra que pode ser um bom preditor de *outcomes* (gravidez clínica e taxa de natalidade).<sup>27</sup>

Estudos afirmam ainda que, a CFA avalia melhor aspetos quantitativos da reserva ovárica (resposta a gonadotrofinas) do que a componentes qualitativos (taxa de nascimento).<sup>21,27</sup> Isso é esperado porque o sucesso das técnicas de PMA é influenciado por múltiplos fatores, não só pelo nº de ovócitos, mas também pela qualidade ovocitária, qualidade do esperma, desempenho do laboratório, nº de embriões obtidos, nº de embriões transferidos, a técnica de transferência embrionária e recetividade endometrial.

Quando tentamos perceber o papel da idade na fertilidade feminina, verificamos que a CFA tem uma associação inversa com a idade, sugerindo uma deterioração da reserva ovárica com a idade, como ficou demonstrado em vários estudos.<sup>28,29</sup>

A avaliação da CFA tem as suas próprias limitações. Uma delas, é a própria definição de Foliculo Antral, que engloba folículos com diâmetro entre 2-10mm, sendo que esta variedade tem sido estudada, no sentido de relacionar o seu tamanho com a função endócrina do folículo. Sanverdi *et al* sugerem que para fazer a hiperestimulação ovárica é preciso uma avaliação simultânea da maturação morfológica e funcional, isto porque, uma discrepância alta entre folículos, pode levar à falha da resposta de muitos deles à FSH, resultando num menor nº de



ovócitos e embriões viáveis. Este crescimento assíncrono é uma explicação plausível para menor resposta aos ciclos com antagonista.<sup>26</sup>

É importante referir que, a avaliação embriológica foi sempre realizada no mesmo centro, com validade interna.

A randomização nunca seria possível neste estudo, isto porque a reserva ovárica é uma característica individual. Algumas mulheres com Síndrome do Ovário Poliquístico foram incluídas no estudo, nomeadamente no grupo com CFA superior a cinco Folículos Antrais, o que pode ter afetado a diferença entre os grupos, já que estas doentes têm um baixo potencial ovocitário para gravidez. Mesmo assim, o teste de gravidez foi mais vezes positivo no grupo com maior contagem de folículos.

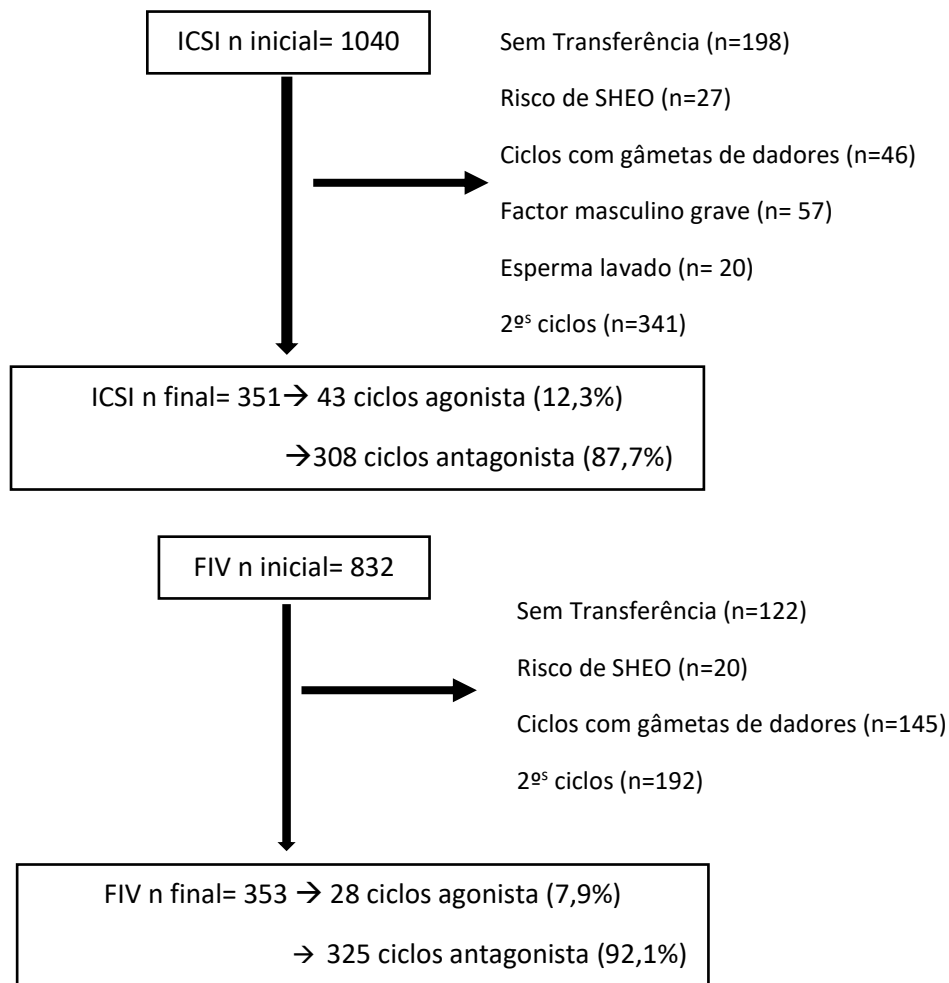
Uma forte vantagem da CFA é a possibilidade de obter um resultado imediato, de forma não invasiva, no entanto, é sabido que, é operador dependente. (30) Christianson *et al.* no estudo que realizaram, concluíram que quase 40% dos médicos entrevistados de diferentes centros, usaram um intervalo de tamanho do folículo para o definir como folículo antral, diferente do que vem na definição (2-10mm).<sup>11</sup> De facto, os exames ecográficos do nosso estudo, foram realizados por diferentes clínicos, com diferentes sondas, o que leva a heterogeneidade na interpretação e utilidade clínica da CFA.

A inclusão de níveis séricos de AMH teria ajudado a fortalecer este estudo, no entanto, a sua utilização no Centro de Procriação Medicamente Assistida do Centro Materno Infantil do Norte é recente, havendo ainda poucos casos em que há registos desta variável.

Concluiu-se neste estudo que a CFA por meio de ecografia transvaginal pode ser usada como fator preditivo do número de ovócitos recuperados em pacientes submetidas a ciclos de hiperestimulação ovárica controlada, bem como da probabilidade de sucesso da FIV e ICSI. A idade mostrou relação inversa com a CFA, demonstrando declínio da quantidade de folículos antrais ao longo dos anos.

É de notar que existem muitos fatores adicionais, além da CFA que influenciam o resultado das técnicas de PMA, e que não foram consideradas neste estudo. No futuro, será necessário continuar a realizar estudos randomizados no sentido de esclarecer a importância do doseamento da HAM, bem como a influência da estrutura endometrial nos *outcomes*.

## Figuras e Tabelas



**Fig. 1-** Fluxograma do nº de casais incluídos e excluídos no estudo

**Tabela I-** Causas de infertilidade

<i>Causa de infertilidade</i>	<i>n FIV</i>	<i>% FIV</i>	<i>n ICSI</i>	<i>% ICSI</i>
<i>Tubar</i>	51	14,4%	6	1,7%
<i>Endometriose</i>	18	5,1%	7	2,0%
<i>Ovulatório</i>	72	20,4%	17	4,8%
<i>Uterino</i>	1	0,3%	2	0,6%
<i>Múltiplos fatores femininos</i>	41	11,6%	5	1,4%
<i>Masculino</i>	63	17,8%	162	46,2%
<i>Fator feminino e masculino</i>	69	19,5%	142	40,5%
<i>Outros</i>	4	1,1%	8	2,3%
<i>Inexplicado</i>	34	9,6%	2	0,6%

**Tabela II-** Características clínicas, demográficos e laboratoriais dos 351 casos submetidos a ICSI

	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Idade elemento feminino (anos)</i>	19	40	33,6	3,7
<i>Idade elemento masculino (anos)</i>	23	54	35,4	4,7
<i>IMC do elemento feminino (kg/m<sup>2</sup>)</i>	17,6	40,2	23,7	3,9
<i>Tempo Infertilidade (anos)</i>	1,0	15,0	3,5	2,1
<i>Day 3 FSH (UI)</i>	2,3	19,9	6,9	2,3
<i>Day 3 LH (UI)</i>	1,9	21,3	5,9	2,5
<i>Dose total Gonadotrofinas (UI)</i>	787,5	7200,0	2093,5	1147,6
<i>Contagem Folículos Antrais</i>	0	15	9,26	3,57
<i>Ovócitos obtidos</i>	1	44	9,3	6,2
<i>Nº embriões normais</i>	0	12	2,4	1,6
<i>Nº embriões transferidos</i>	1	3	1,7	0,5
<i>Taxa fecundação normal (%)</i>	11,1	100	58,1	23,3

**Tabela III-** Características clínicas, demográficos e laboratoriais dos 353 casos submetidos a FIV

	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Idade elemento feminino (anos)</i>	24	40	34,2	3,7
<i>Idade elemento masculino (anos)</i>	25	54	35,7	4,9
<i>IMC do elemento feminino (kg/m<sup>2</sup>)</i>	15,9	40,6	23,8	4,3
<i>Tempo Infertilidade (anos)</i>	0,5	16,0	3,7	2,1
<i>Day 3 FSH (UI)</i>	2,37	24,0	7,2	2,5
<i>Day 3 LH (UI)</i>	1,30	25,5	6,3	2,8
<i>Dose total Gonadotrofinas (UI)</i>	300,0	6300,0	2041,6	1005,8
<i>Contagem Folículos Antrais</i>	0	16	9,00	3,61
<i>Ovócitos obtidos</i>	1	29	8,3	4,9
<i>Nº embriões normais</i>	1	16	3,2	2,3
<i>Nº embriões transferidos</i>	1	3	1,8	0,4
<i>Taxa fecundação normal (%)</i>	0	100	61,3	25,2

**Tabela IV-** Correlação entre a CFA e o nº de ovócitos obtidos, nº de embriões normais obtidos, nados-vivos e FSH, nas ICSI

		<i>Nº de ovócitos obtidos</i>	<i>Nº Embriões normais</i>	<i>Nados-vivos</i>	<i>Day 3 FSH</i>
<i>CFA</i>	Coeficiente de Correlação	0,479	0,215	0,109	-0,172
	Sig. (2 extremidades)	<0,001	<0,001	0,041	0,001

**Tabela V-** Correlação entre a CFA e o nº de ovócitos obtidos, nº embriões normais obtidos, nados-vivos e FSH, nas FIV

		<i>Nº de ovócitos obtidos</i>	<i>Nº Embriões normais</i>	<i>Nados-vivos</i>	<i>Day 3 FSH</i>
<i>CFA</i>	Coeficiente de Correlação	0,415	0,200	0,017	-0,281
	Sig. (2 extremidades)	<0,001	<0,001	0,750	<0,001

**Tabela VI-** Correlação entre a idade do elemento do género FSH, Folículos Antrais e Ovócitos Obtidos nas ICSI

		<i>Day 3 FSH</i>	<i>Folículos Antrais</i>	<i>Ovócitos obtidos</i>
<i>Idade elemento feminino</i>	Correlação de Pearson	0,131	-0,262	-0,205
	Sig. (2 extremidades)	0,014	<0,001	<0,001

**Tabela VII-** Correlação entre a idade do elemento do género feminino e FSH, Folículos Antrais e Ovócitos Obtidos, nas FIV

		<i>Day 3 FSH</i>	<i>Folículos Antrais</i>	<i>Ovócitos obtidos</i>
<i>Idade elemento feminino</i>	Correlação de Pearson	0,083	-0,178	-0,207
	Sig. (2 extremidades)	0,119	0,001	<0,001

**Tabela VIII-** Resultado do b-HCG e nados-vivos

		<i>Frequência ICSI</i>	<i>Percentagem ICSI</i>	<i>Frequência FIV</i>	<i>Percentagem FIV</i>
<u><i>β-HCG</i></u>	Negativo	233	66,4	201	56,9
	Positivo	118	33,6	152	43,1
<u><i>Nados-vivos</i></u>	0	275	78,3	258	73,1
	1	66	18,8	74	21,0
	2	10	2,8	21	5,9

**Tabela IX-** Comparação entre b-HCG positivo e negativo e os grupos formados pela divisão da CFA, nas ICSI

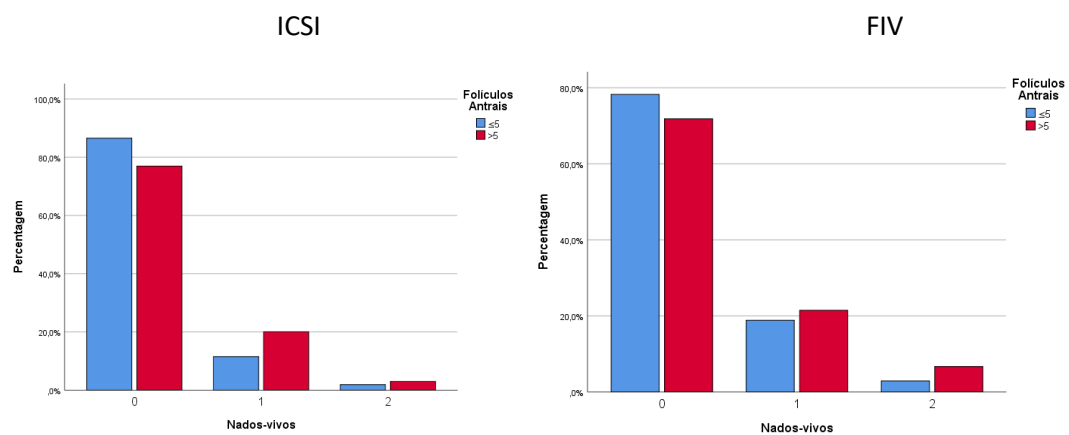
	CFA		
	≤ 5 FA n (%)	> 5 FA n (%)	Total
β-HCG positivo	15 (28,8%)	103 (34,4%)	118
β-HCG negativo	37 (71,2%)	196 (65,6%)	233
Total	52	299	351

Teste X<sup>2</sup> 0,623; p=0,43

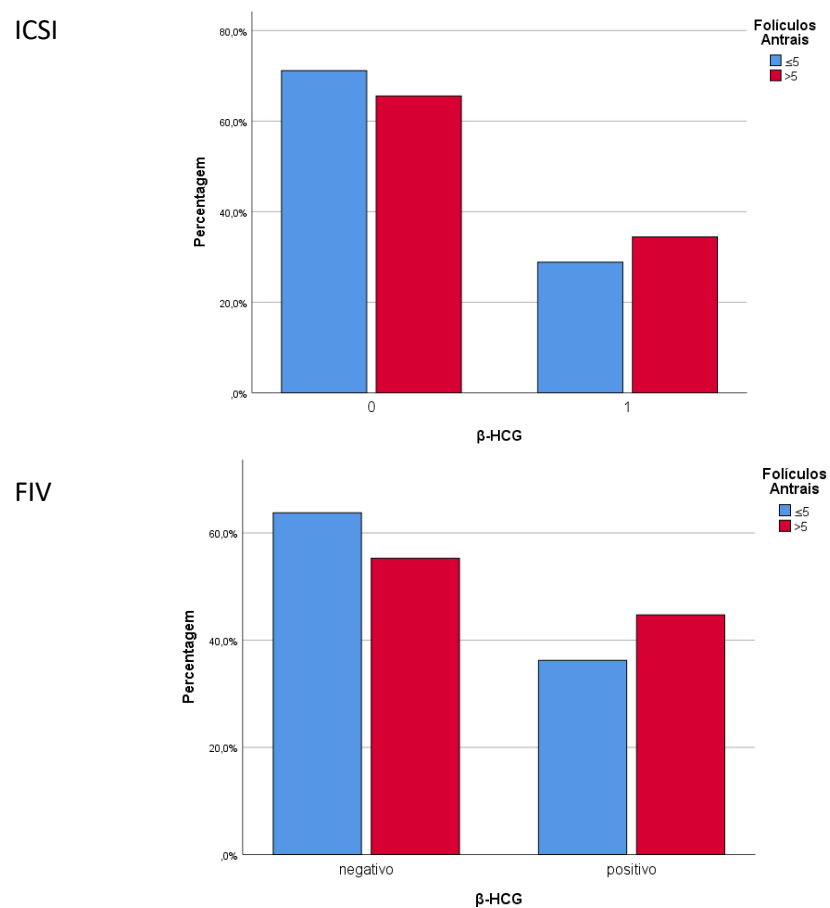
**Tabela X-** Comparação entre b-HCG positivo e negativo e os grupos formados pela divisão da CFA, nas FIV

	CFA		
	≤ 5 FA n (%)	> 5FA n (%)	Total
β-HCG positivo	25 (36,2%)	127 (44,7%)	152
β-HCG negativo	44 (63,8%)	157 (55,3%)	201
Total	69	284	353

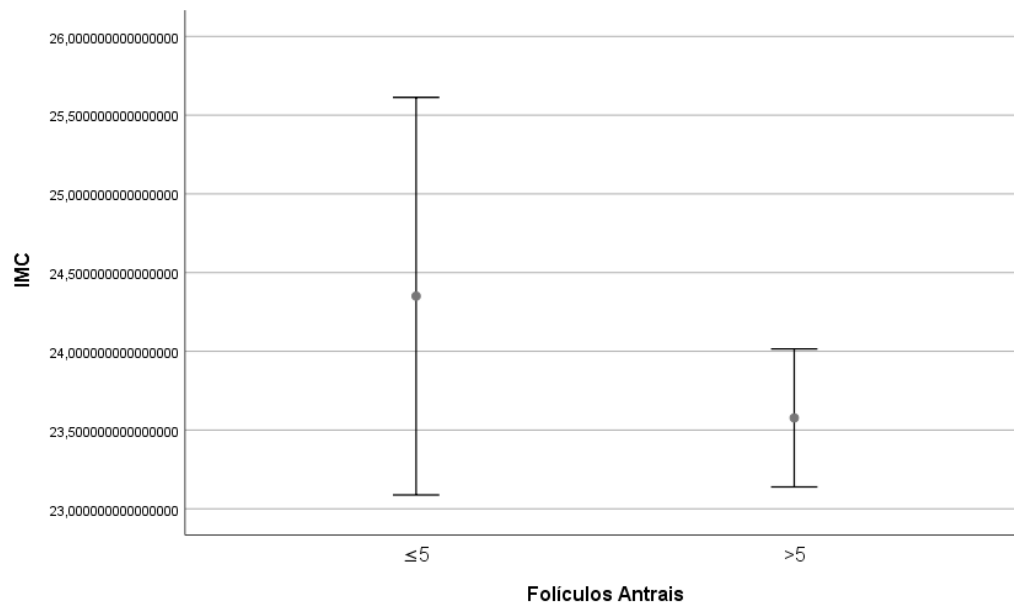
Teste X<sup>2</sup> 1,631; p=0,202



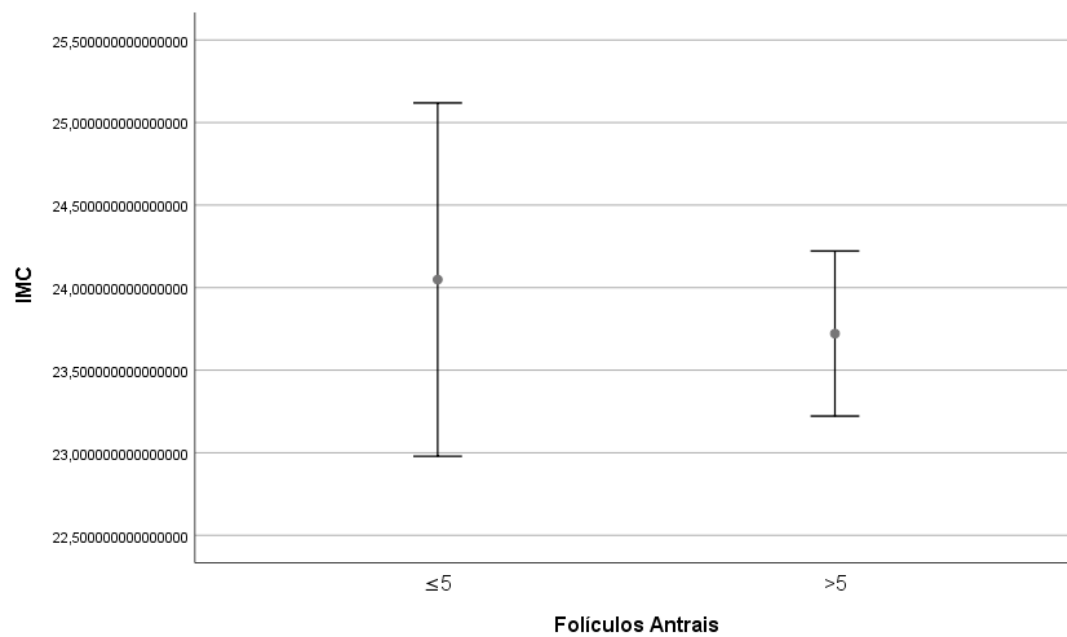
**Fig.2-** Distribuição dos nados-vivos, pelos grupos da Contagem de Folículos Antrais



**Fig.3-** Distribuição do  $\beta$ -HCG, pelos grupos da Contagem de Folículos Antrais



**Fig.4-** Barra de erros de IMC, nos dois grupos de contagem de Folículos Antrais, nas ICSI



**Fig.5-** Barra de erros de IMC, nos dois grupos de contagem de Folículos Antrais, nas FIV

## Bibliografia

1. Park HJ, Lee GH, Gong DS, Yoon TK, Lee WS. The meaning of anti-Müllerian hormone levels in patients at a high risk of poor ovarian response. *Clin Exp Reprod Med*. 2016;43(3):139.
2. Bishop LA, Richter KS, Patounakis G, Andriani L, Moon K, Devine K. Diminished ovarian reserve as measured by means of baseline follicle-stimulating hormone and antral follicle count is not associated with pregnancy loss in younger in vitro fertilization patients. *Fertil Steril*. Dezembro de 2017;108(6):980–7.
3. Fleming R, Seifer DB, Frattarelli JL, Ruman J. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reprod Biomed Online*. Outubro de 2015;31(4):486–96.
4. Shahrokh Tehraninezhad E, Vali-e-Asr Reproductive Health Research Center, Department of Obstetrics and Gynecology, Imam Khomeini Complex Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Mehrabi F, Vali-e-Asr Reproductive Health Research Center, Department of Obstetrics and Gynecology, Imam Khomeini Complex Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Taati R, Vali-e-Asr Reproductive Health Research Center, Department of Obstetrics and Gynecology, Imam Khomeini Complex Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, et al. Analysis of ovarian reserve markers (AMH, FSH, AFC) in different age strata in IVF/ICSI patients. *Int J Reprod Biomed*. 1 de Agosto de 2016;14(8):501–6.
5. Lan VTN, Linh NK, Tuong HM, Wong PC, Howles CM. Anti-Müllerian hormone versus antral follicle count for defining the starting dose of FSH. *Reprod Biomed Online*. Outubro de 2013;27(4):390–9.
6. Yücel B, Kelekci S, Demirel E. Decline in ovarian reserve may be an undiagnosed reason for unexplained infertility: a cohort study. *Arch Med Sci*. 2018;14(3):527–31.
7. Tolikas A, Tsakos E, Gerou S, Prapas Y, Loufopoulos A. Anti-Mullerian hormone (AMH) levels in serum and follicular fluid as predictors of ovarian response in stimulated (IVF and ICSI) cycles. *Hum Fertil*. Dezembro de 2011;14(4):246–53.
8. Tal R, Seifer DB. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am J Obstet Gynecol*. Agosto de 2017;217(2):129–40.
9. Tsakos E, Tolikas A, Daniilidis A, Asimakopoulos B. Predictive value of anti-müllerian hormone, follicle-stimulating hormone and antral follicle count on the outcome of ovarian stimulation in women following GnRH-antagonist protocol for IVF/ET. *Arch Gynecol Obstet*. Dezembro de 2014;290(6):1249–53.
10. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. Dezembro de 2012;98(6):1407–15.



11. Christianson MS, Shoham G, Tobler KJ, Zhao Y, Cordeiro CN, Leong M, et al. Measurement of antral follicle count in patients undergoing in vitro fertilization treatment: results of a worldwide web-based survey. *J Assist Reprod Genet.* Outubro de 2015;32(10):1435–40.
12. Jamil Z, Fatima S, Cheema Z, Baig S, Choudhary R. Assessment of ovarian reserve: Anti-Mullerian hormone versus follicle stimulating hormone. *J Res Med Sci.* 2016;21(1):100.
13. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 1 de Dezembro de 2006;12(6):685–718.
14. Zebitay AG, Cetin O, Verit FF, Keskin S, Sakar MN, Karahuseyinoglu S, et al. The role of ovarian reserve markers in prediction of clinical pregnancy. *J Obstet Gynaecol.* 19 de Maio de 2017;37(4):492–7.
15. Keane K, Cruzat VF, Wagle S, Chaudhary N, Newsholme P, Yovich J. Specific ranges of anti-Mullerian hormone and antral follicle count correlate to provide a prognostic indicator for IVF outcome. *Reprod Biol.* Março de 2017;17(1):51–9.
16. Pilsgaard F, Grynnerup AG-A, Løssl K, Bungum L, Pinborg A. The use of anti-Müllerian hormone for controlled ovarian stimulation in assisted reproductive technology, fertility assessment and -counseling. *Acta Obstet Gynecol Scand* [Internet]. 30 de Março de 2018 [citado 21 de Maio de 2018]; Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/aogs.13334>
17. Chen Y, Ye B, Yang X, Zheng J, Lin J, Zhao J. Predicting the outcome of different protocols of *in vitro* fertilization with anti-Muüllerian hormone levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Int Med Res.* Junho de 2017;45(3):1138–47.
18. Broer SL, Mol BWJ, Hendriks D, Broekmans FJM. The role of antimullerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count. *Fertil Steril.* Março de 2009;91(3):705–14.
19. Coelho Neto MA, Ludwin A, Borrell A, Benacerraf B, Dewailly D, da Silva Costa F, et al. Counting ovarian antral follicles by ultrasound: a practical guide: Consensus Opinion. *Ultrasound Obstet Gynecol.* Janeiro de 2018;51(1):10–20.
20. ERSAHIN AA, ARPACI H, ERSAHIN SS, CELIK N, ACET M. AFC vs. AMH: prediction of ovarian response in women with endometrioma undergoing controlled ovarian stimulation. :5.
21. Silva GM da, Diniz ALD, Bernardino Neto M, Marcolini TT, Perillo LCA, Pires W de P, et al. Número de folículos antrais e o sucesso da fertilização in vitro: uma análise multivariada. *Rev Bras Ginecol E Obstetrícia.* Outubro de 2014;36(10):473–9.
22. Majumder K, Gelbaya TA, Laing I, Nardo LG. The use of anti-Müllerian hormone and antral follicle count to predict the potential of oocytes and embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Junho de 2010;150(2):166–70.

23. Jacobs MB, Klonoff-Cohen H, Agarwal S, Kritz-Silverstein D, Lindsay S, Garzo VG. Predictors of treatment failure in young patients undergoing in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* Agosto de 2016;33(8):1001–7.
24. Chalumeau C, Moreau J, Gatimel N, Cohade C, Lesourd F, Parinaud J, et al. Establishment and validation of a score to predict ovarian response to stimulation in IVF. *Reprod Biomed Online.* Janeiro de 2018;36(1):26–31.
25. Kotanidis L, Nikolettos K, Petousis S, Asimakopoulos B, Chatzimitrou E, Kolios G, et al. The use of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels and antral follicle count (AFC) to predict the number of oocytes collected and availability of embryos for cryopreservation in IVF. *J Endocrinol Invest.* Dezembro de 2016;39(12):1459–64.
26. Sanverdi I, Ozkaya E, Kucur S, Bilen D, Eken M, Bilgic B. Antral Follicle Diameter Variance Within Each Ovary May Be A Predictor For Poor Response In Cases With Normal Ovarian Reserve. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [Internet]. 31 de Janeiro de 2018 [citado 21 de Maio de 2018]; Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0043-125404>
27. Zakhari A, Ates S, Shaulov T, Dahan MH. Does ovarian reserve affect outcomes in single ideal blastocyst transfers in women less than 40 years of age? *Arch Gynecol Obstet.* Janeiro de 2018;297(1):233–9.
28. Wiweko B, Prawesti DMP, Hestiantoro A, Sumapraja K, Natadisastra M, Baziad A. Chronological age vs biological age: an age-related normogram for antral follicle count, FSH and anti-Müllerian hormone. *J Assist Reprod Genet.* Dezembro de 2013;30(12):1563–7.
29. Bozdog G, Calis P, Zengin D, Tanacan A, Karahan S. Age related normogram for antral follicle count in general population and comparison with previous studies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Novembro de 2016;206:120–4.
30. Alebić M š, Stojanović N, Dewailly D. Discordance between serum anti-Müllerian hormone concentrations and antral follicle counts: not only technical issues. *Hum Reprod.* 1 de Junho de 2018;33(6):1141–8.